Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung Tübingen
Direktor: Professor Dr. Gerhard Schramm

ZUR BIOSYNTHESE VON DESOXYRIBONUKLEINSÄURE.

Die Konzentration von Thymidin-3'-Triphosphat in Zellen von E. coli.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HERMANN SEILER
aus Würzburg

9766

1968

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung Tübingen
Direktor: Professor Dr. Gerhard Schramm

ZUR BIOSYNTHESE VON DESOXYRIBONUKLEINSÄURE.

Die Konzentration von Thymidin-3'-Triphosphat in Zellen von E. coli.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HERMANN SEILER
aus Würzburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Graumann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Schramm
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. K. Hinrichsen

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schramm danke ich, daß er es mir ermöglichte, an seinem Institut zu lernen und zu arbeiten. Für die großzügige Unterstützung, die er mir zur Durchführung der Arbeit gewährte, danke ich ihm herzlich. Mein besonderer Dank gilt ihm wie auch Herrn Dr. Heinz Schaller für die Bereitschaft, mir bei der Einarbeitung und Durchführung der Arbeit zu helfen. Wichtige Anregungen und wertvolle Kritik verdanke ich ihnen neben dem Interesse an vielen Fragen in der Molekularbiologie.

Seite

Inhaltsangabe

Abkürzungen 5

A. Einleitung

1) Problem- und Aufgabenstellung 6

2) Planung des Experimentes 9

B. Material und Methoden

1) Bakterien 12

2) Medien 12

3) Chemikalien 12

4) Enzyme 13

5) Bestimmung des Bakterientiters 13

6) Bestimmung der Radioaktivität, Zählausbeute 13

7) Einbau von ^{3}H-Thymin in säureunlösliches Material 14

8) Einbau von ^{3}H-5-BU und ^{32}P-Orthophosphat, Präparation von DNS und CsCl-Dichtegradient 15

9) Einbau von ^{32}P-Orthophosphat und Darstellung des Nukleotidpools 17

10) Säulenchromatographie

a) DEAE-Zellulose 18

b) DEAE-Sephadex A 25 18

11) Enzymatischer Abbau von Nukleotid-5'-Phosphodiestern

a) nach Chromatographie über DEAE-Zellulose 19

b) nach Chromatographie über DEAE-Sephadex 20

12) Dünnschichtchromatographie

a) Herstellung von PEI-Zellulose-Platten 20

b) Eindimensionale Chromatographie 21

c) Zweidimensionale Chromatographie 21

Seite

C. Experimente

1) DNS-Synthese unter Phosphathunger 22

2) Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^{32}P in DNS unter Phosphathunger 22

3) Nachweis von 3'-TTP im Zellextrakt 25

D. Ergebnisse und Diskussion

1) DNS-Synthese unter Einbaubedingungen 31

2) Spezifische Aktivität von ^{32}P in DNS unter Phosphathunger 31

3) Konzentration von 3'-TTP im Zellextrakt 33

4) Mechanismus der DNS-Synthese

a) Berechnung der größtmöglichen Syntheserate für DNS-Synthese via 3'-TTP 35

b) Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren 37

Zusammenfassung 39

Literaturverzeichnis 40

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547604_0103

Abkürzungen

(d)ATP = (Desoxy)Adenosin-5'-Triphosphat

5-BU = 5-Bromuracil

cpm = counts pro minute

(d)CTP = (Desoxy)Cytidin-5'-Triphosphat

DNS = Desoxyribonukleinsäure

DEAE = Diaethylaminoaethylen

E. coli = Escherichia coli

(d)GTP = (Desoxy)Guanosin-5'-Triphosphat

PEI = Polyaethylenimin

OD = Optische Dichteeinheit

RNS = Ribonukleinsäure

TCA = Trichloressigsäure

TDP = Thymidin-5'-Diphosphat

TMP = Thymidin-5'-Monophosphat

3'-TTP = Thymidin-3'-Triphosphat

5'-TTP = Thymidin-5'-Triphosphat

TG-Medium = Tris-Glucose-Medium

UTP = Uridin-5'-Triphosphat

UV = Ultraviolett

VDE = Venomphosphodiesterase

A. Einleitung

1) Desoxyribonukleinsäure (DNS) ist Träger der genetischen Information[1]. Diese wird bei jeder Zellteilung an die entstehenden Tochterzellen weitergegeben. Dieser Vorgang verlangt vor jeder Zellteilung eine Verdopplung des Erbgutes: Eine Replikation der DNS.

Der Mechanismus der DNS-Replikation ist bis heute noch nicht geklärt.

DNS ist ein hochpolymeres Molekül, dessen einzelne Bausteine Nukleoside sind, die durch Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'- und 5'-C-Atomen benachbarter Ribosemoleküle verknüpft sind (Abb. 1). DNS liegt in vivo - jedenfalls bei Bakterien - als Doppelstrang vor, dessen einzelne Stränge

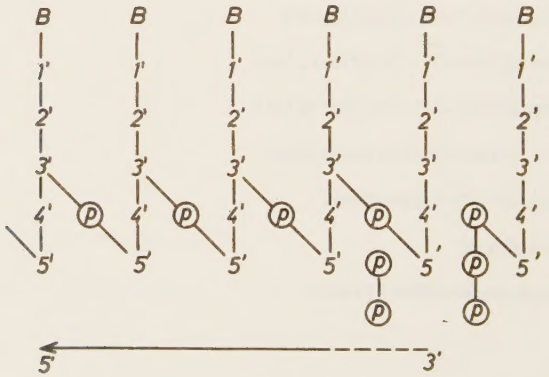


Abb. 1 Aufbau der DNS und Mechanismus der Kornbergschen Reaktion.
Die Zahlen 1' bis 5' bezeichnen die C-Atome von 2'-desoxy-Ribose, P eine Phosphatgruppe, B symbolisiert eine der vier Basen Thymin, Cytosin, Adenin und Guanin. Der Pfeil soll die Polarität des DNS-Stranges deutlich machen.

entgegengesetzte Polarität zeigen[2]. Kornberg isolierte aus Coli-Bakterien ein Enzym (DNS-Polymerase, "Kornbergpolymerase"), welches aus Desoxynukleosid-5'-Triphosphaten unter Abspaltung von Pyrophosphat DNS synthetisiert[3] (Abb. 1).

Autoradiographische Aufnahmen zeigen, daß der Doppelstrang der DNS bei der Replikation sich reißverschlußartig öffnet und an den beiden freien Schenkeln die neue DNS synthetisiert wird (Abb. 2). Das bedeutet, daß sowohl das 3'- als auch das 5'-Ende

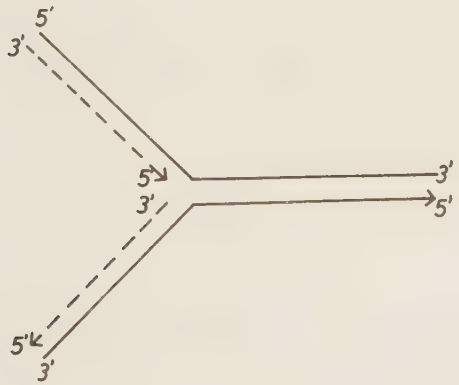


Abb. 2 Mechanismus der DNS-Replikation.
Ein Pfeil symbolisiert einen DNS-Strang. Der gestrichelte Pfeil stellt neusynthetisierte DNS dar. Die Wachstumsrichtung ist von links nach rechts.

der DNS bei der Replikation der DNS chemisch reagieren muß.[4] Da die Kornbergpolymerase - jedenfalls in vitro - ausschließlich Polymerisation am 3'-Hydroxylende der DNS ermöglicht[5], muß für das Wachstum des 5'-Endes der DNS nach einem anderen Synthesemechanismus gesucht werden.

Wenn als Substrat Triphosphate verwendet würden, die nicht am 5'-C-Atom, sondern am 3'-C-Atom aktiviert sind, so könnte entsprechend dem Mechanismus der Kornbergschen Reaktion mit dem 5'-Hydroxylende der DNS eine 5'-3'-Phosphodiesterbindung geknüpft werden. (Abb. 3). Diese Möglichkeit wird seit der

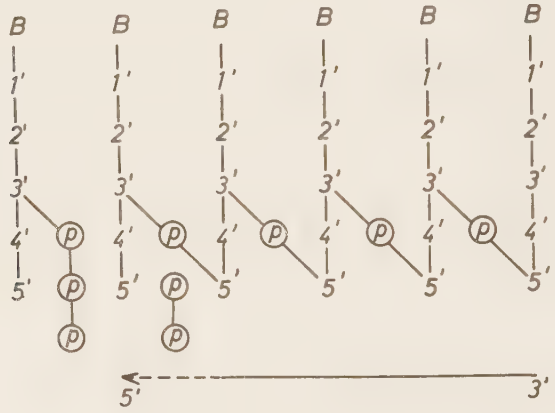


Abb. 3 Wachstum des 5'-Endes eines DNS-Stranges durch Polymerisation von Desoxynukleosid-3'-Triphosphat. Zeichen wie Abb. 1.

DNS-Polymerase diskutiert[6,7]. Es ließen sich jedoch mit den bisherigen Methoden ausschließlich Nukleosid-5'-Triphosphate nachweisen. Eine Prüfung des Modells durch Einbau von 3'-Triphosphaten in vivo ist nicht möglich, da die Zellwand für geladene Moleküle dieser Größe impermeabel ist.

Cannelakis u.a. wiesen in Extrakten von B. subtilis eine Enzymaktivität nach, welche die Phosphorylierung von 3'-TDP zu 3'-TTP katalysiert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe eines

10-fachen Überschusses an 5'-TDP nicht beeinflußt[8]. Josse reinigte aus Extrakten von E. coli Kinasen, die spezifisch für Desoxynukleosid-3'-monophosphate sind[9]. Diese Befunde lassen an einen Synthesemechanismus denken, bei welchem Desoxynukleosid-3'-Triphosphate Intermediärprodukte der DNS-Synthese sind.

In dieser Arbeit soll mit empfindlicheren Methoden untersucht werden, ob in Zellen von E. coli eines dieser vier Desoxynukleosid-3'-Triphosphate, nämlich 3'-TTP, nachzuweisen ist.

Planung des Experimentes

Aus eigenen Vorversuchen ging hervor, daß der Gehalt an Nukleosid-3'-Triphosphaten unter 5% der 5'-Isomeren liegt. Daher muß das Experiment von vornherein darauf angelegt werden, geringste Mengen 3'-TTP nachzuweisen bzw. das Vorhandensein von 3'-TTP in der Zelle auszuschließen.

Der Nachweis von Stoffen, die nur in sehr niedriger Konzentration in der Zelle vorliegen, wird ermöglicht durch eine radioaktive Markierung der gesuchten Substanz. Dabei lassen sich um so geringere Mengen nachweisen, je höher die spezifische Aktivität ist, mit welcher die gesuchte Substanz markiert ist. Andererseits erspart die selektive Markierung der gesuchten Substanz manchen Reinigungsschritt. Eine Markierung mit ^{32}P ist einer solchen mit ^{3}H-Thymin vorzuziehen, da ^{32}P-Orthophosphat in einem ^{31}P-freien Medium in einer sehr hohen spezifischen Aktivität angeboten und eingebaut werden kann.

Dabei muß jedoch geprüft werden, ob die DNS-Synthese unter Einbaubedingungen nicht beeinträchtigt wird, da ja ein Intermediärprodukt der DNS-Synthese gesucht wird. Als Kontrolle läßt sich die DNS-Synthese unter Phosphathunger durch Einbau von ^{3}H-Thymin in die Thyminauxotrophen Bakterien messen. Eine Beeinträchtigung der DNS-Synthese durch die hohe Radioaktivität läßt sich durch Zunahme der teilungsfähigen Bakterien ausschließen.

Bei einer Markierung mit ^{32}P werden eine Reihe von Reinigungsschritten notwendig, um alle phosphathaltigen Substanzen vollständig abzutrennen. Das gesuchte 3'-TTP läßt sich von dem Isomeren 5'-TTP durch Chromatographie nicht abtrennen. Deshalb muß zur Reinigung neben der chromatographischen eine enzymatische Methode hinzugezogen werden: Mit einer Phosphodiesterase aus Schlangengift (VDE) lassen sich Nukleosid-5'-Triphosphate zu Nukleosid-5'-monophosphaten spalten. Nukleosid-3'-Triphosphate werden dagegen durch das Enzym nicht zerstört[10]. Die abgebauten Nukleotide lassen sich dann durch erneute Chromatographie von den nicht abgebauten Nukleosid-3'-Triphosphaten abtrennen.

Die Ausbeute an 3'-TTP während der Reinigung läßt sich durch die Zugabe von ^{14}C-markiertem 3'-TTP feststellen. Eine Schwierigkeit bereitet es, einen geeigneten Marker zu finden, der bei der chromatographischen Auftrennung anzeigt, in welcher Fraktion sich das gesuchte 3'-TTP findet. Das zur Kontrolle zugegebene ^{14}C-3'-TTP ist bei einem großen Überschuß an ^{32}P-Aktivität wegen der Überlagerung der Energiespektren nicht zu

entdecken. Große Mengen an 3'-TTP, das sich durch seine UV-Absorption als Marker eignen würde, belasten die Analyse und machen eine papierchromatographische Reinigung unmöglich. Da sich 3'-TTP und 5'-TTP chromatographisch nicht unterscheiden, läßt sich auch letzteres als Marker verwenden. Es bietet den Vorteil, daß es durch enzymatischen Abbau leicht zu beseitigen ist. Deswegen wurde zur Darstellung des möglicherweise vorhandenen 3'-TTP sowohl ^{14}C-3'-TTP als auch nichtmarkiertes 5'-TTP zugegeben.

Um aus der ^{32}P-Aktivität der gereinigten Substanz die Konzentration an 3'-TTP zu berechnen, muß die spezifische Aktivität bekannt sein, mit welcher 3'-TTP markiert würde. Diese wird nun sicher nicht so hoch sein wie im Medium, da ja die Zelle über einen eigenen Phosphatpool verfügt. Doch sollte die spezifische Aktivität von ^{32}P in dem gesuchten 3'-TTP der in neusynthetisierter DNS gleich sein, da DNS ja unmittelbares Produkt von 3'-TTP wäre.

Neusynthetisierte DNS kann durch Einbau von 5-Bromuracil, einem Basenanalogon von Thymin[11], im CsCl-Dichtegradienten isoliert werden[12]. Dabei wird DNS in einer CsCl-Lösung der Dichte von DNS so hochtourig zentrifugiert, daß sich in dem entstehenden Dichtegradienten die spezifisch schwerere BU-haltige DNS von normaler DNS trennt. Verwendet man Tritiummarkiertes BU bekannter spezifischer Aktivität, so läßt sich aus dem Verhältnis der ^{32}P- zur ^{3}H-Aktivität die spezifische Aktivität von ^{32}P in DNS ermitteln.

B. Material und Methoden

1) Bakterien

Alle Versuche wurden mit E. coli Stamm 15 $A^-T^-U^-$ ausgeführt, der Arginin-, Thymin- und Uracil-bedürftig ist. Diese Mutante erhielten wir freundlicherweise von Herrn Dr. Bonhoeffer.

2) Medien

Alle Versuche wurden in Tris-Glucose-Medium (TG) ausgeführt. 1 l Medium enthält 0,5 g NaCl, 8 g KCl, 1,1 g NH_4Cl, 0,2 g $MgCl_2 6H_2O$, 12,1 g Trispuffer (freie Base), 0,8 g Na-pyruvat, 0,16 mMol Na_2SO_4. Diese Lösung wurde mit konzentrierter HCl auf pH 7,4 titriert und anschließend autoklaviert. Danach wurden zu je einem l Medium 1 µg $FeCl_3$, 0,294 g $CaCl_2$, 5 ml 40% Glucose und 10 µg Vitamin B_1 steril zugegeben. Dieses TG-Medium wurde unter Normalbedingungen mit 20 µg/ml Arginin, 20 µg/ml Uracil, 24 µg/ml Thymin und 0,64 µMol/ml Na_2HPO_4 (= 20 µg P/ml) versetzt.

3) Chemikalien

Alle nicht markierten Triphosphate waren mit Ausnahme von 5'-d-GTP und 3'-TTP Handelspräparate von Calbiochem, Luzern. Chromatographische Prüfung ergab, daß jeweils nur ca. 60% als Triphosphat, der Rest als das entsprechende Di- bzw. Monophosphat vorlagen. 5'-d-GTP wurde von Herrn Beyersmann synthetisiert, 3'-TTP wurde von Herrn Schaller aus Thymidin synthetisiert und gereinigt.

Tritium-markiertes Thymin (125 mC/mMol) und Tritium-markiertes 5-Bromuracil (1 mC/mg) wurden von Radiochemical Center, Amersham, England, geliefert. Tritium-markiertes 5'-TTP (4,8 mC/µMol) war ein Präparat der Firma Schwarz BioResearch, Inc., Orangeburg, New York. ^{14}C-3'-TTP wurde von Herrn Schaller aus ^{14}C-3'-TMP synthetisiert und gereinigt. Letzteres stammte von der Firma New England Nuclear Corp., Boston, USA.

4) Enzyme

Venomphosphodiesterase (VDE) war von Herrn Schaller aus rohem Schlangengift gereinigt worden. VDE hatte eine Aktivität von 8000 E/ml[10] gegenüber 1,5 E/ml 5'-Nukleotidase-Aktivität[13]. Das Enzym war frei von Phosphatase-Aktivität[14]. Reines Lysozym wurde von Boehringer und Söhne, Mannheim, geliefert.

5) Bestimmung des Bakterientiters

Dazu wurden insgesamt 3 bis 8 × 10^2 Bakterien auf 2 Platten (Ø 8 cm) mit Nähr-Agar plattiert, für ca. 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Kolonien ausgezählt.

) Bestimmung der Radioaktivität, Zählausbeute

Die Radioaktivität von Flüssigkeiten wurde bestimmt, indem zwischen 2 und 20 µl auf einem Membranfilter (Membranfiltergesellschaft Göttingen Nr.3) getrocknet wurden und in 5 ml Toluolszintillator (1 l Toluol enthält 5 g 2,5 Diphenyloxazol und 0,3 g Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxozolyl) benzol) im Packard Tri-Carb-Szintillationszähler gemessen wurde. Die Zählausbeute

betrug für ^{32}P 75%, für ^{14}C 55% und für ^{3}H 12,8% der Gesamtzerfälle. Ebenfalls im Toluolszintillator wurde die Radioaktivität von Flecken der Dünnschichtchromatogramme bestimmt. Die Zählausbeute betrug bei einer Fleckengröße von ca. 1 cm^2 für ^{32}P 70%, für ^{14}C 45% und für ^{3}H 8-10% der Gesamtzerfälle. Mußten mehr als 20 µl benutzt werden, um die Radioaktivität von Flüssigkeiten zu messen, so wurden diese - wenn sie sauer oder alkalisch waren - neutralisiert und in 5 ml Dioxanszintillator in dem gleichen Zählgerät gemessen. (1 l Dioxan enthält 4 g Diphenyloxazol, 0,2 g 1,4 Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)benzol, 60 g Naphthalin, 18 ml Äthylenglycol und 127 ml Methanol). Die Zählausbeute war etwa gleich der Membranfilter in Toluol, schwankte jedoch besonders für ^{3}H-Aktivitäten bei unterschiedlichem Salzgehalt und Flüssigkeitsmengen.

Die Aktivität von Toluol und Dioxanszintillator-Leerwertproben betrug im ^{32}P-Kanal 12,5 cpm, im ^{14}C-Kanal 9,5 cpm und im ^{3}H-Kanal 13 cpm. Alle Proben wurden so lange gezählt, daß mindestens 1000 cpm, bei wichtigen Proben sogar 2000 cpm gezählt wurden. Da ^{32}P eine Halbwertszeit von 14,3 Tagen hat, sind alle in den Experimenten angegebenen ^{32}P-Aktivitäten bezogen auf den Zeitpunkt des Versuchsendes.

7) Einbau von ^{3}H-Thymin in säureunlösliches Material

Bakterien wuchsen über mehrere Generationen bei 37°C unter Belüftung in TG-Medium, das mit Arginin, Thymin, Uracil und Phosphat ergänzt war. Bei einem Zelltiter von ca. $1,5 \times 10^{8}$/ml

wurden 8 ml steril filtriert, mit reinem TG-Medium von 37°C gewaschen und in 8 ml TG-Medium von 37°C resuspendiert, das Arginin, Uracil und Thymin, jedoch kein Phosphat enthielt. Nach Zugabe von 10 µC ^{3}H-Thymin wurden 4 ml dieser Kultur mit Phosphat versetzt. Beide Kulturen wurden in einem Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert.

Im Zeitraum von 40 Min. wurden Zeitwerte genommen und dazu 0,5 ml Proben mit 1 mg Herings-DNS versetzt und mit 0,2 ml 1 M TCA (Trichloressigsäure) gefällt. Säuregefälltes Material wurde über einen Rohrzuckergradienten (5,4% bis 23% Rohrzuckerlösung, 0,1 M in TCA) in einer Zentrifuge der Firma Stock bei 0°C mit 3000 Upm (= 2000 g) in 30 Min. abzentrifugiert. Der Überstand des Gradienten wurde bis auf 1 ml vorsichtig abgesaugt, der Rest mit 0,2 mMol NaOH alkalisiert und das Sediment resuspendiert. Nachdem erneut 0,3 mMol TCA zugegeben waren, wurden die Proben über ein Membranfilter Nr. 3 filtriert und nochmals mit Thymin-haltiger 1% TCA gewaschen. Die getrockneten Filter wurden in Toluolszintillator gezählt.

8) Einbau von ^{3}H-5-Bromuracil und ^{32}P-Orthophosphat, Präparation von DNS und CsCl-Dichtezentrifugation

Bakterien wurden für mehrere Generationen Wachstum in TG-Medium mit Arginin, Thymin, Uracil und Phosphat bei 37°C belüftet, bei einem Zelltiter von ca. 2×10^{8}/ml filtriert, gewaschen mit warmem TG-Medium und in TG-Medium von 37°C resuspendiert, das Arginin und Uracil, aber weder Thymin noch Phosphat enthielt. Zu 4 ml dieser Kultur wurden 0,1 µC ^{32}P-

Orthophosphat gegeben und davon 3 1 ml-Proben im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit bis zu 30 Min. wurden zu je einer Probe 10 µg ^{3}H-5-BU gegeben und 10 Min. weiterinkubiert. Die Proben wurden dann auf 0°C abgekühlt, filtriert, mit Phosphat und BU-haltigem TG-Medium gewaschen und in 1 ml 0,05 M Trispuffer pH 8 bei 0°C resuspendiert.

DNS wurde präpariert, indem zu jeder Probe 0,01 mMol EDTA und 1 mg Lysozym zugegeben wurden und anschließend 5 Min. lang auf 37°C erwärmt wurde. Nach Zugabe von 1 mg Dodecylsulfat (SDS) konnte Lyse der Bakterien beobachtet werden. Das Lysat wurde für 5 Min. auf 65°C erwärmt. Um DNS durch Scherkräfte zu zerkleinern, wurde die Lösung 6 x durch eine 5 cm lange Nadel mit einem Durchmesser von 0,2 mm zerspritzt.

Die Proben wurden auf ein Volumen von 2,0 ml gebracht. 2,65 g ultrareines CsCl wurde zugegeben, so daß die Lösung eine Dichte von 1,702 hatte. Diese Lösung wurde in einen Zentrifugenbecher des SW 39 Rotors gefüllt, mit Paraffinöl überschichtet und in einer Spinco Ultrazentrifuge Modell L 2 bei 15°C 20 h lang mit 35 000 Upm und ohne Unterbrechung weitere 20 h bei 30 000 Upm zentrifugiert. Zur Analyse des Gradienten wurden Fraktionen von je 4 Tropfen gleicher Größe durch eine Kapillare am Boden des Tubus gesammelt. Zu jeder Fraktion wurden 50 µg Thymus DNS zugegeben, mit 5% TCA gefällt und über Membranfilter Nr. 3 filtriert. Die getrockneten Filter wurden in Toluolszintillationsflüssigkeit ausgezählt.

g) Einbau von ^{32}P-Orthophosphat und Darstellung des Nukleotidpools

Bakterien wuchsen über mehrere Generationen bei 37°C unter Belüftung in TG-Medium mit Arginin, Uracil, Thymin und Phosphat. Bei einem Titer von ca. 3×10^8/ml wurden ca. 50 ml filtriert, gewaschen mit warmem TG-Medium und resuspendiert in 50 ml TG-Medium von 37°C, welches Arginin, Uracil und Thymin, jedoch kein Phosphat enthielt. 10 mC reines ^{32}P-Orthophosphat wurden zugegeben und die Kultur anschließend bei 37°C belüftet. Nach 20 Min. wurde der Einbau durch Zugabe von 1 ml konzentrierter HCl und 2 mMol H_3PO_4 gestoppt. Gleichzeitig wurde ^{14}C-3'-TTP zugegeben und auf 0°C abgekühlt.

Zur Abtrennung des anorganischen Phosphats und Darstellung des Nukleotidpools (nach Lehmann u.a.[15]) wurde die Suspension bei 0°C 10 Min. lang mit 10 000 Upm in einer Sorvallzentrifuge zentrifugiert, der Überstand mit 1 ml 20% Aktivkohle gemischt und auf einem Membranfilter abfiltriert. Die Kohle wurde anschließend mehrmals mit 0,1 M HCl, mit 0,1 M H_3PO_4 und dann mit H_2O gewaschen. Zur Elution der Nukleotide wurde die Kohle in 5 ml 50% Äthylalkohol suspensiert, der 0,4 M in NH_4OH war. Nach Zugabe von 2,5 OD_{260nm} 3'-TTP† wurde die Suspension bei 30°C geschüttelt, die Kohle abzentrifugiert und der Überstand filtriert. Die Elution wurde noch zweimal wiederholt, jedoch ohne daß erneut 3'-TTP zugegeben wurde.

---

† 1 OD = 1 Optische Dichteeinheit ist die Menge eines Stoffes, die in 1 ml gelöst bei 1 cm Schichtdicke die Extinktion 1 ergibt. 1 OD_{260nm} TTP = 0,1 µMol TTP

Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur eingedampft und dann in 10 ml H_2O gelöst.

10) Säulenchromatographie

a) Chromatographie über DEAE-Zellulose:
DEAE (diaethylaminoaethylen)-Zellulose (Fabrikat der Firma SERVA, Heidelberg) hatte eine Kapazität von 3,6 mval/g. Die Größe der Säule betrug 1 cm^2 × 17,5 cm.

Die zu chromatographierende Lösung (5 bzw. 10 ml, weniger als 0,05 N) wurde zusammen mit 6-12 OD_{260nm} 5'-TTP als Träger - bei Chromatographieschritt IV zusammen mit ^{3}H-5'-TTP - auf die Säule gegeben. Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,05 - 0,2 bzw. von 0,02 - 0,15 M NH_4HCO_3, titriert mit Ammoniak auf pH-Werte zwischen 7,5 und 9,0 , über ein Volumen von 250 ml. Absorption des Eluates wurde gemessen und registriert bei 260 mμ mit einem Gerät der Firma LKB. Gleichzeitig wurde die relative ^{32}P-Aktivität gemessen und synchron aufgeschrieben mit einem Gerät der Firma Frieseke und Höpfner, Erlangen. Fraktionen von 4,85 ml wurden mit einem Tropfenzähler gesammelt. Die Fraktionen, die TTP enthielten, wurden bei Zimmertemperatur in einem Rotationsverdampfer mehrmals eingedampft, um das Salz des Elutionsmittels zu entfernen. Um beim Eindampfen Schaumbildung zu vermeiden, wurden einige Tropfen Oktanol zugegeben.

b) Chromatographie über DEAE-Sephadex A 25:
DEAE-Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Schweden) hatte eine Kapazität von 3,2 mval/g. Die zu chromatographierende Lösung (5ml)

wurde mit 1 M Essigsäure auf pH 3,5 gebracht und ohne zusätzlichen Träger auf die mit 0,05 M Ammoniumformiat, pH 3,5, vorgewaschene Säule gegeben. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0,05 - 1 M NaCl über 400 ml. Das Elutionsmittel war 0,05 M in Ammoniumformiat, pH 3,5. Die Chromatographie erfolgte bei 4°C. Die Messung der UV-Absorption und die Fraktionierung des Eluates wurde mit den gleichen Geräten durchgeführt. Auf eine synchrone Messung der relativen ^{32}P-Aktivität wurde wegen der zu geringen Empfindlichkeit des Zählgerätes verzichtet. Bei manchen Fraktionen wurde die Absorption bei Wellenlängen zwischen 230 und 300 nm mit einem Zeiss-Photometer gemessen.

Zur Entsalzung der TTP-haltigen Fraktionen wurden diese (20 ml) mit 0,5 ml 1 M HCl und 0,2 ml 20% Aktivkohle versetzt und filtriert. Die Kohle wurde anschließend mehrmals mit H_2O gewaschen. Elution erfolgte in 2 ml 50 Vol% Äthylalkohol, 0,4 M in NH_4OH, wie bei dem zuvor angegebenen Verfahren. Die Elution wurde auch hier noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Eluate wurden eingedampft und in 300 µl H_2O gelöst. Um die Ausbeute an TTP bei diesem Schritt zu überprüfen, wurde vor der Adsorption ^{3}H-5'-TTP zusammen mit 0,6 OD 5'-TTP zugegeben.

1) Enzymatischer Abbau von Nukleosid-5'-phosphodiestern

a) nach Chromatographie über DEAE-Zellulose:

Die Reaktion wurde ausgeführt in einem Volumen von 5 ml. Diese enthielten 0,05 mMol TrisHCl, pH 8,8, 0,02 mMol Glycin, pH 9,5, 0,005 mMol $MgCl_2$. Bei den ersten zwei Inkubationen betrug die

Enzymmenge 80 E VDE, dann nur noch je 40 E. Bei den Reaktionen, die mit 80 E Enzym ausgeführt wurden, wurden je 0,5 OD jedes der 4 Ribo- und Desoxynukleosidtriphosphate zugegeben. Diese Lösung wurde bei 37°C inkubiert. Nach 30 Min. wurden 12 bzw. 6 OD 5'-TTP zugegeben und 30 Min. weiterinkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 0,01 mMol EDTA.

b) nach Chromatographie über DEAE-Sephadex:
Ein Sechstel der nach der Entsalzung gewonnenen Lösung (50 µl) wurden mit 0,5 µMol Tris (freie Base) auf ein pH zwischen 8,5 und 9,0 gebracht (gemessen mit pH-Papier Merck) und mit 0,02 µMol $MgCl_2$ und 0,8 E VDE 30 Min. bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Inkubation wurde durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie eines kleinen Teils (ca. 5%) geprüft.

12) Dünnschichtchromatographie nach E.u.K. Randerath

a) Herstellung von PEI-Zellulose-Platten:
PEI (Polyaethylenimin) war ein Geschenk der Firma BASF, Ludwigshafen. 2 x dialysiertes PEI (100 g gegen 10 l H_2O jeweils 12 h) wurde mit HCl neutralisiert und auf 100 g/l verdünnt. 100 g Zellulose (MN 300, Macherey und Nagel, Düren), 100 ml 1o% PEI-Lösung und 560 ml H_2O wurden 45 Sek. in einem Homogenisator gemischt und anschließend auf entfettete Polyaethylenfolien (Renolit-Werke GmbH, Waldkraiburg, Fabrikat EH 9000, 0,30 mm) mit einer Schichtdicke von 0,3 mm aufgetragen. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurden 20 x 20 cm

große Platten ca. 5 cm weit mit 0,5 M NaCl und sofort anschließend mit H_2O in geschlossenen Tanks vorgewaschen. Die getrockneten Platten wurden in Aluminiumfolie verpackt und bei -30°C aufbewahrt.

b) Eindimensionale Chromatographie zur Gruppentrennung von Nukleosidmono-, di- und triphosphaten:

Die zu untersuchende Substanz wurde ca. 3 cm über dem unteren Rand zusammen mit 0,2 OD Mono-, Di- und Triphosphat aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Platte in einen Tank mit einem 0,5 cm hohen Spiegel einer Lösung gestellt, welche 1 M in Ameisensäure und 0,6 M in LiCl war. Die Chromatographie wurde bei 2°C ausgeführt. Bis das Laufmittel 15 cm weit gelaufen war, dauerte es ca. 1 h.

c) 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie zur Trennung von allen 8 Nukleosidtriphosphaten:

Die zu chromatographierenden Substanzen wurden in einem Volumen bis zu 0,1 ml zusammen mit je 0,1 - 0,2 OD der 4 Ribo- und Desoxynukleosidtriphosphate aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Platte in wasserfreiem destillierten Methanol 10 Min. gebadet, um mitaufgetragenen Trispuffer zu lösen. Die Chromatographie wurde exakt nach der Methode von Neuhardt und Randerath[17] ausgeführt.

Die Verteilung der ^{32}P-Radioaktivität ließ sich autoradiographisch darstellen, indem Agfa Rö-Sino-Filme 48 h lang aufgepreßt wurden. Die Verteilung der Nukleosidtriphosphate konnte bei Betrachtung in kurzwelligem UV-Licht gesehen werden.

C. Experimente

1) DNS-Synthese unter Phosphathunger

Exponentiell wachsende Bakterien wurden in einem ^{3}H-Thymin-haltigen Medium mit und ohne Phosphat bei 37°C inkubiert und der ^{3}H-Einbau in säureunlösliches Material gemessen. Dazu wurden 0,5 ml Proben aufgearbeitet wie unter Material und Methoden (B 7) beschrieben. Die spez. Aktivität des Thymins betrug 8×10^{5} cpm/µMol. Der Bakterientiter zu Beginn der Inkubation wurde auf $1,6 \times 10^{8}$/ml bestimmt.

Abb. 4 zeigt den gemessenen Einbau von ^{3}H-Thymin. Er beträgt unter Normalbedingungen 5,0 cpm/10^{8}/Min., was einer Menge von $2,8 \times 10^{4}$ Molekülen Thymin/Zelle/Min. entspricht. Unter Phosphathunger geht der Thymineinbau langsamer: 3,6 cpm/10^{8}/Min. entsprechen $2,0 \times 10^{4}$ Molekülen Thymin/Zelle/Min. Die Generationszeit, gemessen über 60 Min., betrug unter Normalbedingungen 40 Min., unter Phosphathunger 55 - 60 Min.

2) Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^{32}P in neusynthetisierter DNS bei Markierung mit reinem ^{32}P-Orthophospha
(^{31}P-Phosphathunger)

Exponentiell wachsende Bakterien wurden bei 37°C in einem Medium inkubiert, dem weder Thymin noch ^{31}P-Phosphat zugegeben war, und welches ^{32}P-Orthophosphat in einer Aktivität von $3,6 \times 10^{4}$ cpm/ml enthielt. Der Zelltiter betrug

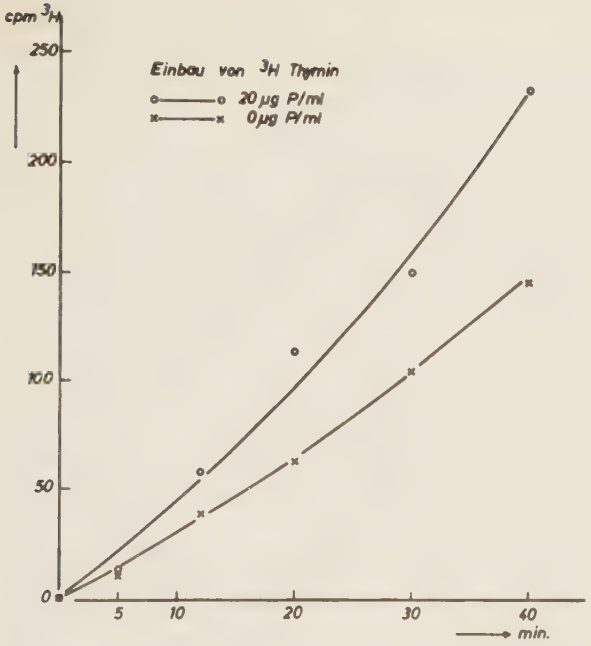


Abb. 4 Einbau von ^{3}H-Thymin in säureunlösliches Material unter Normalbedingungen und unter Phosphathunger. Versuchsbedingungen siehe Exp. 1).

$1{,}9 \times 10^{8}$/ml. Nach einer Inkubation von 10, 20 und 30 Min. wurde zu je 1 ml Bakteriensuspension 10γ ^{3}H-5-BU (spez.Akt. $4{,}5 \times 10^{7}$ cpm/ Mol) zugegeben und je 10 Min. weiterinkubiert. Die BU-haltige DNS wurde im CsCl-Dichtegradienten isoliert (Abb. 5, a - c). Das Verhältnis von ^{3}H- / ^{32}P-Aktivität betrug im Maximum der ^{3}H-Aktivität nach 10 Min. 9,4, nach 20 Min. 6,6 und nach 30 Min. 8,0. Daraus läßt sich unter bestimmten Voraussetzungen die spezifische Aktivität des Phosphors in der isolierten DNS berechnen (Diskussion, Abschnitt 2).

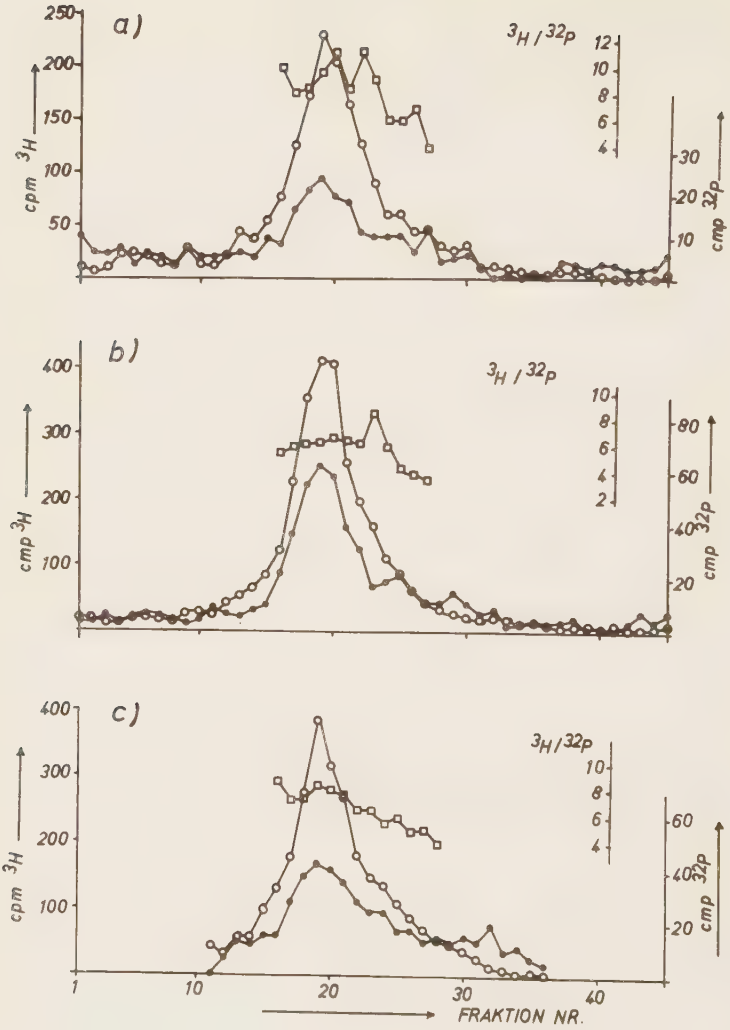


Abb. 5 CsCl-Dichtegradienten von "halbschwerer" DNS nach Inkubation von Bakterien ($1{,}9 \times 10^{8}$/ml) für a) = 10 Min., b) = 20 Min., c) = 30 Min. in einem Medium mit ^{32}P-Phosphat ($3{,}6 \times 10^{4}$ cpm/ml) unter ^{31}P-Phosphat- und Thyminhunger. Anschließend Inkubation für 10 Min. nach Zugabe von 10γ ^{3}H-BU (spez.Akt. $4{,}5 \times 10^{7}$ cpm/µMol)

o——o cpm ^{3}H •——• cpm ^{32}P □——□ $^{3}H/^{32}P$

3) Nachweis von 3'-TTP im Zellextrakt

Zur Markierung von 3'-TTP wurde reines ^{32}P-Orthophosphat mit einer Aktivität von insgesamt $1{,}14 \times 10^{10}$ cpm in 50 ml Medium angeboten, dem kein ^{31}P-Phosphat zugegeben war. Die Inkubation wurde nach 20 Min. durch Zugabe von HCl gestoppt. Sofort anschließend wurde ^{14}C-3'-TTP mit einer Aktivität von insgesamt 15 000 cpm zugegeben. Der Zelltiter betrug zu Beginn der Inkubation 3×10^8/ml, am Ende $4{,}6 \times 10^8$/ml.

Der säurelösliche Überstand wurde mit Aktivkohle versetzt und filtriert. Nach Zugabe von 2,5 OD_{260nm} 3'-TTP wurden die an Kohle adsorbierten Substanzen - im wesentlichen wird es sich dabei um Nukleotide handeln - mit ammoniakalischem Äthylalkohol eluiert. Da sich an Kohle adsorbierte Nukleotide mit dieser Methode nicht quantitativ eluieren lassen, wurde die Elution insgesamt dreimal vorgenommen.

Zur weiteren Reinigung von 3'-TTP wurde das Eluat alternierend chromatographiert und mit VDE, einer Nukleosid-5'-phosphodiesterase, behandelt. In Tabelle I sind die einzelnen Reinigungsschritte und die Aktivitäten der nach jeder Chromatographie gewonnenen Fraktionen dargestellt.

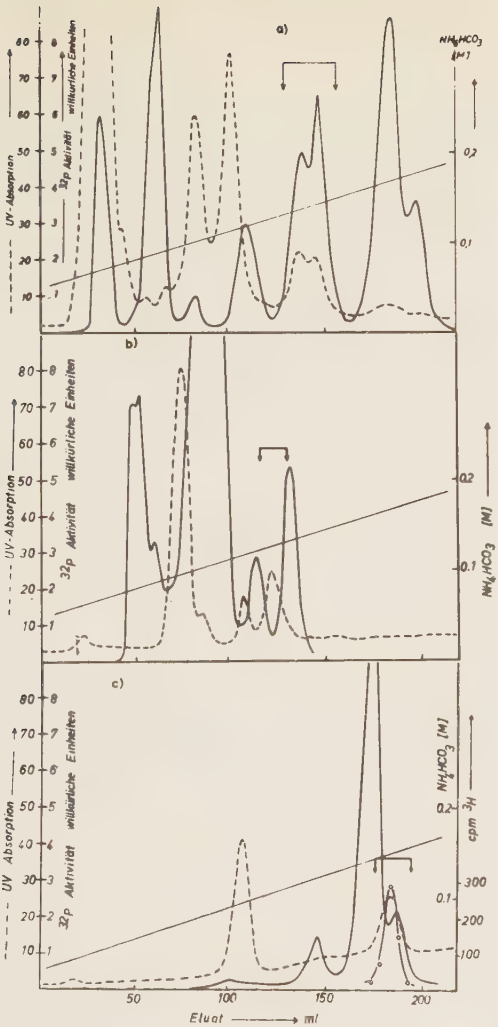
Abb. 6 a - d zeigt die Ergebnisse jeder einzelnen Säulenchromatographie. Jeweils die durch Pfeile markierten Fraktionen, welche das als Träger zugegebene 5'-TTP enthalten (UV-Absorption bzw. ^{3}H-Aktivität), wurden mit VDE inkubiert und weiter gereinigt. Worum es sich bei den von TTP abgetrennten Substanzen handelt, wurde nicht weiter untersucht.

Tabelle I

Reinigung von 3'-TTP aus ^{32}P-markiertem Zellextrakt

Reinigungsschritt	^{32}P-Aktivität nach Reinigung	^{3}H-Aktivität nach Reinigung (5'-TTP)
Medium	$1{,}14 \times 10^{10}$ cpm	
Adsorption an Kohle und Elution I	$9{,}8 \times 10^{8}$	
II	$6{,}3 \times 10^{8}$	
III	$4{,}5 \times 10^{7}$	
zusammen	$1{,}65 \times 10^{9}$	
a) Chromatographie über DEAE-Zellulose pH 7,5	$3{,}5 \times 10^{8}$	
b) Inkubation mit VDE und Chromatographie über DEAE-Zellulose pH 9,0	$1{,}1 \times 10^{7}$	
c) Inkubation mit VDE und Chromatographie über DEAE-Zellulose pH 8,0	$3{,}64 \times 10^{6}$	$5{,}6 \times 10^{5}$ cpm
d) Inkubation mit VDE und Chromatographie über DEAE-Sephadex pH 3,5	$3{,}57 \times 10^{5}$	2×10^{3} $+1{,}8 \times 10^{5}$
Adsorption an Kohle und Elution (dreimal)	$5{,}5 \times 10^{4}$	$1{,}1 \times 10^{5}$

Abb. 6 Säulenchromatographie zur Reinigung von 3'-TTP. Bedingungen siehe Tab. I. Jeweils die durch Pfeile markierten (TTP-haltigen) Fraktionen wurden für den folgenden Reinigungsschritt verwandt.
^{3}H-Aktivitäten (5'-TTP bzw. 5'-TMP) beziehen sich in Abb. 3c auf 5 µl/Fraktion, in 3d ebenso wie ^{32}P auf 50 µl/Fraktion (4,85 ml).


a)
b)
c)
UV-Absorption
32P Aktivität willkürliche Einheiten
NH4HCO3 (M)
cpm 3H
Eluat → ml
50
100
150
200

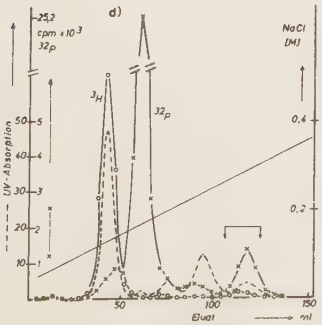

d)
25,2 cpm ×10-3 32P
UV-Absorption
3H
32P
NaCl (M)
cpm 3H
0,4
0,2
1000
500
Eluat → ml
50
100
150

Abb. 6

Die Ausbeute an 3'-TTP und damit der Reinigungserfolg bei den einzelnen Schritten läßt sich nicht exakt angeben, da die Aktivität des zugegebenen ^{14}C-3'-TTP (15 000 cpm) bei dem Überschuß an ^{32}P-Aktivität nicht meßbar war. Nur für die Adsorption an Kohle und die anschließende Elution nach der letzten Säulenchromatographie d) läßt sich die Ausbeute von zugegebenem ^{3}H-5'-TTP und damit wohl auch von 3'-TTP angeben. Sie betrug 65%. Aus der Abnahme der ^{32}P-Aktivität auf 15% ergibt sich damit bei diesem Schritt eine Reinigung um den Faktor 4. Einen Ausbeutefaktor von 65% wird man entsprechend auch für den ersten Kohleschritt annehmen können. Aus der Abnahme der ^{3}H-Aktivität bei der letzten Säulenchromatographie (d) (Abb. 6 d) läßt sich der Wirkungsgrad des vorangegangenen enzymatischen Abbaus ermitteln. Danach wurde 5'-TTP zu mehr als 99% abgebaut. Da bei dieser Chromatographie kein 5'-TTP als Träger zugegeben war, wird die UV-Absorption der gewonnenen Fraktionen von 0,7 OD_{260nm} (Spektrum von TTP) durch 3'-TTP bedingt sein, was einer Ausbeute von ca. 30% des bei dem ersten Kohleschritt zugegebenen 3'-TTP entspricht.

Da die Dünnschichtchromatographie durch geringe Verunreinigungen und größere Substanzmengen gestört wird, wurden die weiteren Reinigungsschritte nur mit 1/6 des bei dem zweiten Kohleschritt gewonnenen Eluates vorgenommen. Dieses wurde in einem kleinen Volumen mit geringen Mengen VDE behandelt. Um den Erfolg des Abbaus von 5'-TTP zu überprüfen, wurden ca. 5% zur Trennung von TTP und TMP eindimensional dünnschichtchromatographiert. Danach wurde ^{3}H-5'-TTP zu mehr als 95% abgebaut, während die ^{32}P-aktiven Substanzen gegen VDE resistent waren.

Bei der folgenden zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie konnten alle 8 zugegebenen Nukleosidtriphosphate aufgetrennt werden (Abb. 7). Die von diesem Chromatogramm belichtete Rö-Platte zeigt, daß der größte Teil der ^{32}P-Aktivität von TTP abgetrennt werden konnte (Abb. 7). Der TTP-Fleck und seine Umgebung wurde in einzelnen Sektoren entnommen und ausgezählt (Tabelle II). Dabei findet sich ^{14}C-Aktivität wieder und zwar scharf begrenzt auf den TTP-Fleck, während die ^{32}P-Aktivität der Umgebung mit 20 - 30% der Aktivität des TTP-Fleckes relativ hoch liegt. Das Verhältnis von ^{32}P- / ^{14}C-Aktivität im Zentrum des TTP-Fleckes (I) betrug $8,5 \times 10^{-2}$.

Tabelle II

Aktivität von ^{3}H-5'-TTP, ^{14}C-3'-TTP und ^{32}P-Verbindungen des TTP-Fleckes (I - III) und seiner Umgebung (IV - VIII) des zweidimensionalen Dünnschichtchromatogramms (Abb. 7)

Fleck im Chromatogramm	^{3}H-Aktivität	^{32}P-Aktivität	^{14}C-Aktivität	$\frac{^{32}P}{^{14}C}$
	cpm	cpm	cpm	
I	100,4	6,1	71,6	0,0852
II	98,2	11,0	118,6	0,0928
III	52,8	18,8	83,7	0,2248
IV	0,5	5,7	0,8	7,125
V	0,9	4,1	0,9	4,555
VI	0,9	3,9	0,9	4,333
VII	1,9	4,8	1,1	4,363
VIII	1,0	4,0	1,0	4,0

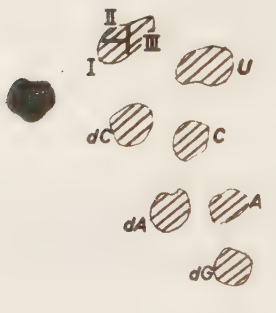


Abb. 7 Autoradiogramm des zweidimensionalen Dünnschichtchromatogramms (letzter Reinigungsschritt). Die UV-Absorption der zugegebenen 8 Nukleosidtriphosphate ist in das Autoradiogramm eingezeichnet (A = ATP, dA = dATP, (d)G = (d)GTP, (d)C = (d)CTP, U = UTP, I + II + III = 5'-TTP).

D. Ergebnisse und Diskussion

1) DNS-Synthese unter Einbaubedingungen

Um die Geschwindigkeit der DNS-Synthese unter den Einbaubedingungen des Experimentes 3 (Nachweis von 3'-TTP) zu untersuchen, wurde der Thymineinbau in säureunlösliches Material unter Phosphathunger und zur Kontrolle auch unter Normalbedingungen gemessen (Experiment 1). Thymineinbau in säureunlösliches Material ist ein Maß für DNS-Synthese, wenn der verwendete Stamm selbst kein Thymin synthetisieren kann[18]. Diese Voraussetzung ist hier erfüllt. DNS enthält zu 25% Thymidylsäure[19]. Danach ergibt der in Experiment 1 gemessene Thymineinbau von $2{,}8 \times 10^4$ bzw. $2{,}0 \times 10^4$ Molekülen Thymin/Zelle/Min. eine Syntheserate von $1{,}1 \times 10^5$ Nukleotiden/Zelle/Min. unter Normalbedingungen bzw. von $8{,}0 \times 10^4$ Nukleotiden/Zelle/Min. unter Phosphathunger, also den Einbaubedingungen der Experimente 2 und 3.

Der Einbau von ^{32}P-Orthophosphat in solch hoher Aktivität wie Experiment 3 beeinträchtigt die DNS-Synthese nicht. Dies zeigt der Anstieg der Kolonien bildenden Bakterien von 3,0 auf $4{,}6 \times 10^8$/ml während der Inkubation von 20 Min. in Experiment 3.

2) Spezifische Aktivität von ^{32}P in DNS unter Phosphathunger

Die spezifische Aktivität, mit welcher ^{32}P in DNS eingebaut wird, wenn der Zelle kein weiteres Phosphat angeboten wird, läßt sich aus den Ergebnissen des Experimentes 2 bestimmen.

Die ^{3}H-BU-haltigen Fraktionen enthalten die DNS, die jeweils 10, 20 und 30 Min. nach Zugabe von reinem ^{32}P-Orthophosphat 10 Min. lang gebildet wurde. Aus dem Verhältnis ^{3}H / ^{32}P läßt sich die spezifische Aktivität des Phosphors dieser Fraktionen berechnen und der des Phosphors in neusynthetisierter DNS gleichsetzen, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

1) Alle ^{32}P und ^{3}H enthaltenden Substanzen müssen von DNS abgetrennt sein. Diese Bedingung ist erfüllt, da RNS eine andere Dichte als BU-DNS hat, und da unspezifisch verteilte Bruchstücke durch Säurefällung der DNS entfernt wurden.
2) Jedes Molekül Thymin des neusynthetisierten DNS-Stranges muß durch ein Molekül ^{3}H-BU ersetzt sein. Auch diese Bedingung ist erfüllt, da leichte (nur Thymin enthaltende) DNS, die unter Thyminhunger nur in geringsten Mengen synthetisiert werden konnte, im CsCl-Dichtegradienten von halbschwerer DNS (bei welcher in einem Strang Thymin durch BU ersetzt ist) abgetrennt wird, und etwa bei Fraktion 30 eine Bande bilden würde[18]. Entsprechend ist auch das Verhältnis ^{3}H / ^{32}P über das Maximum der ^{3}H-Aktivität ungefähr konstant.

Danach entfallen in dem neusynthetisierten DNS-Strang auf ein Molekül ^{3}H-BU vier Moleküle Phosphor[19]. Bei einer spezifischen Aktivität von $4{,}5 \times 10^{7}$ cpm/µMol des ^{3}H-BU berechnet sich aus dem Verhältnis ^{3}H / ^{32}P von 9,4 bzw. 6,6 bzw. 8,0 eine spezifische Aktivität des Phosphors von

$1{,}2 \times 10^6$ bzw. $1{,}7 \times 10^6$ bzw. $1{,}4 \times 10^6$ cpm/µMol P für die Inkubationszeiten von 10 bzw. 20 bzw. 30 Min. in reinem ^{32}P-Medium, bevor ^3H-BU eingebaut werden konnte.

Ob die unterschiedlichen Werte durch die unterschiedliche Inkubationsdauer bedingt sind oder auf Meßfehlern beruhen, läßt sich nicht entscheiden. Die Auswertung des Experimentes 3 wird daher mit der mittleren spezifischen Aktivität von $1{,}4 \times 10^6$ cpm/µMol P durchgeführt.

3) Die Konzentration von 3'-TTP in der Zelle

Aus den Ergebnissen des Experimentes 3 läßt sich der größtmögliche Gehalt an 3'-TTP in der Zelle berechnen. Dazu muß die spezifische Aktivität bekannt sein, mit welcher ^{32}P in 3'-TTP eingebaut würde. Diese läßt sich der spezifischen Aktivität des Phosphors in neusynthetisierter DNS gleichsetzen, da ja 3'-TTP als unmittelbare Vorstufe in der DNS-Synthese gesucht wird.

Die spezifische Aktivität des Phosphors in neuer DNS läßt sich aus den Ergebnissen des Experimentes 2 auch für das Experiment 3 nach Gleichung 1a berechnen, wenn die einer Zelle für die DNS-Synthese zur Verfügung stehende Phosphatmenge (Pz) in beiden Versuchen gleich groß ist. Pz ist dabei definiert mit

$$sA = \frac{^{32}P}{N \times Pz} \qquad (1)$$

sA = spez. Aktivität des Phosphors in neuer DNS

^{32}P = Aktivität des Mediums

N = Zellzahl

Pz ist für Experiment 2 und 3 gleich, da sie durch die Zugabe von 10 mC trägerfreiem ^{32}P-Orthophosphat ($8{,}25 \times 10^{-5}$ µM/mC) zu mehr als 10^{10} Bakterien nicht wesentlich geändert wird. Danach gilt

$$sA_3 = \frac{^{32}P_3 \times N_2}{^{32}P_2 \times N_3} \times sA_2 \qquad (1a)$$

Die Indices beziehen sich auf die Nummer des Experimentes.

Aus folgenden Werten

$sA_2 = 1{,}4 \times 10^6$ cpm/µMol P

$^{32}P_2 = 3{,}6 \times 10^4$ cpm/ml

$N_2 = 1{,}9 \times 10^8$ Zellen/ml

$^{32}P_3 = 1{,}14 \times 10^{10}$ cpm

ergibt sich

$$N_3 \times sA_3 = 8{,}4 \times 10^{19} \frac{\text{cpm}}{\text{µMol P/Zelle}} \qquad (1b)$$

Die Größe $N_3 \times sA_3$ stellt für Versuch 3 die Beziehung her zwischen der ^{32}P-Aktivität einer Substanz und ihrer Konzentration in der Zelle, angegeben in µMol P/Zelle.

Die ^{32}P-Aktivität, die von ^{14}C-3'-TTP nicht abgetrennt wurde, ergibt sich aus dem Verhältnis ^{32}P / ^{14}C von 0,085 am Ende der Reinigung (Tabelle II). Bezogen auf den gesamten Ansatz, der 15 000 cpm ^{14}C-3'-TTP enthielt, beträgt die Aktivität dieser Substanz 1278 cpm. Diese entspricht nach(1b) $1{,}5 \times 10^{-16}$ µMol P/Zelle, was eine Konzentration von 3 Molekülen bedeuten würde. Berücksichtigt man noch, daß mindestens ein Teil der Aktivität durch einen unspezifischen "background" bedingt ist, wie die Verteilung der Aktivität auf dem Dünnschichtchromatogramm zeigt (Tabelle II), so kann man einen 3'-TTP-Gehalt von mehr als 3 Molekülen/Zelle ausschließen.

4) Mechanismus der DNS-Synthese

Welche Aussagen lassen sich aus diesem Ergebnis über den Mechanismus der DNS-Synthese machen? Das in der Einleitung besprochene Modell, bei welchem das 5'-OH-Ende des einen DNS-Stranges durch Reaktion mit einem 3'-Triphosphat wächst, läßt sich durch folgende Überlegungen mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen.

a) Die Syntheserate eines DNS-Einzelstranges beträgt unter Einbaubedingungen mehr als 4×10^4 Nukleotide/Min. (1×10^4 Thyminnukleotide/Min.). Da nur ein Wachstumspunkt pro Chromosom existiert,[18] entspräche dies der Wechselzahl des Enzyms, welches Kettenwachstum am 5'-Ende der DNS bewirkt. Um zu berechnen, ob die 3'-TTP-Konzentration von 4 Molekülen pro Zelle ausreicht, um diese Synthesegeschwindigkeit zu ermöglichen, machen wir folgenden Ansatz:

Für eine Reaktion

$$S + E \underset{k_{II}}{\overset{k_I}{\rightleftharpoons}} SE \longrightarrow E + S_I$$

beträgt die Reaktionsgeschwindigkeit

$$-\frac{d(S)}{dt} = k_I\,(E)(S) - k_{II}\,(ES) \qquad (2)$$

bzw.

$$-\frac{d(S)}{dt} \leftarrow k_I\,(E)(S) \qquad (2a)$$

Wäre die Reaktionsgeschwindigkeit ausschließlich durch Diffusion begrenzt, so gilt

$$-\frac{d(S)}{dt} \leftarrow k_d\,(E)(S) \qquad (3)$$

Dabei ist k_d definiert mit[21]

$$k_d = \frac{4\pi \times N_A(D_E + D_S)}{a^{\int^{\infty}} \times e^{-U/kT} \times dr/r^2}$$

(N_A = Avogadrokonstante, D_E und D_S = Diffusionskoeffizienten von E und S im Lösungsmittel, a = nächstmögliche Entfernung zwischen E und S, k = Boltzmannkonstante, U = potentielle Energie zwischen 2 Molekülen E und S, die den Abstand r haben, T = abs. Temperatur).

Nach einer Berechnung von Eigen[21] kann für Reaktionen mit relativ langsam diffundierenden Stoffen, wie Enzym-Substratreaktionen, die Größe k_d in Wasser bei 27°C den Wert von 10^9 $M^{-1}sec^{-1}$ nicht überschreiten. Tatsächlich liegen die experimentell bestimmten k_I-Werte für solche Reaktionen zwischen 10^6 und 10^8 $M^{-1}sec^{-1}$. Da die Diffusionskoeffizienten von Molekülen mit einem Molekulargewicht zwischen 300 und 50 000 in Rohextrakten von E. coli 3 - 10 mal kleiner sind als in Wasser[22], wird man annehmen können, daß dieser k_d-Grenzwert auch für in vivo Reaktionen gilt. Für 37°C wird er mit 2×10^9 $M^{-1}sec^{-1}$ angenommen.

Für die Reaktion, die zwischen einem am 5'-OH-Ende der DNS befindlichen Enzym (E) und einem Molekül 3'-TTP (S) stattfinden könnte, läßt sich Gleichung 3 anwenden unter der Voraussetzung, daß 3'-TTP im gesamten Zellvolumen frei diffundieren könnte und nicht schon bei seiner Synthese an eine Struktur gebunden würde, die eine Konzentrationssteigerung in der nächsten Umgebung des Enzyms ergäbe. Die molare

Konzentration von (S) ergibt sich aus dem Zellvolumen. Mitchell[23] gibt für coliforme Stäbchen bei einem Trockengewicht von $3{,}6 \times 10^{-13}$ g ein Volumen von 10^{-15} l an. Unser Stamm hatte ein Trockengewicht von 5×10^{-13} g [24]. Das Zellvolumen wird demnach mit 10^{-15} l nicht überschätzt. Bei 3 Molekülen 3'-TTP/Zelle ergäbe sich nach Gleichung 3 eine maximale - nur durch Diffusion begrenzte - Reaktionsgeschwindigkeit von weniger als 10 Molekülen 3'-TTP/sec/Enzymmolekül (= 600 Moleküle TTP/Min.). Da dieser Grenzwert mehr als eine 10-Potenz unter der geforderten Syntheserate von Thymidinnukleotiden liegt, kann DNS-Synthese via 3'-TTP unter der oben gemachten Voraussetzung (freie Diffusion des Substrats) wohl ausgeschlossen werden.

b) In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen stehen Messungen der Poolgröße von DNS-Vorstufen in E. coli B [25]. Nach äußerst kurzen Pulsen mit ^{3}H-Thymidin wurde die spezifische Aktivität des Thymidins in der DNS und in Thymidinnukleotiden von E. coli B bestimmt. Danach muß die Zelle ca. 10^4 Nukleotide DNS synthetisieren, ehe ^{3}H-Thymidin mit halbmaximaler Rate in DNS eingebaut wird. Die gleichzeitig gemessene spezifische Aktivität von 5'-TTP ist dabei proportional der Tritium-Einbaurate in DNS. Wenn wir annehmen, daß der Syntheseweg von 3'-TTP über das 3'-TMP verliefe, so müßte der Gesamtpool der Thymidin-3'-phosphate aus mindestens 10^4 Molekülen bestehen. VDE-resistente 3'-Thyminnukleotide konnten jedoch auch in diesem Stamm nicht nachgewiesen werden.

Eine letzte Möglichkeit wäre, wenn für die DNS-Synthese 3'-TTP als Substrat dient, welches durch eine Isomerase aus 5'-TTP direkt am Ort der Synthese gebildet wird. Diese Lücke wird durch die Arbeit von Price u.a. geschlossen[26]. Die Autoren finden bei einer Thymin-bedürftigen Mutante von E. coli nach Pulsmarkierung mit $^{32}PO_4$ signifikante Unterschiede in der spezifischen Aktivität der Desoxynukleosid-5'-Triphosphate. Analysiert man die neusynthetisierte DNS nach Hydrolyse zu 5'-Nukleotiden bzw. 3'-Nukleotiden, so findet man gleiche Unterschiede nur bei den 5'-Nukleotiden, jedoch keine bei den 3'-Nukleotiden. Das beweist, daß 3'-Nukleotide nicht aus 5'-Nukleotiden synthetisiert werden.

Damit erscheint eine DNS-Synthese über 3'-TTP und damit auch über andere Desoxynukleosid-3'-Triphosphate ausgeschlossen.

Zusammenfassung

Um zu prüfen, ob und in welcher Menge 3'-TTP als Metabolit in der DNS-Synthese in Coli-Zellen vorkommt, wurden Zellen des Stammes E. coli 15 $A^-T^-U^-$ in reinem ^{32}P-Orthophosphat inkubiert, aufgearbeitet und 3'-TTP gereinigt. Zur Abtrennung des möglicherweise vorhandenen 3'-TTP aus den hochmarkierten Zellextrakten von Nukleosid-5'-Triphosphaten wurden letztere enzymatisch abgebaut und chromatographisch getrennt. Die Konzentration an 3'-TTP pro Zelle wurde berechnet aus der gefundenen ^{32}P-Aktivität und der spezifischen Aktivität von ^{32}P-Phosphat in neusynthetisierter DNS. Letztere wurde gemessen, indem neusynthetisierte DNS mit $^{32}PO_4$ und ^3H-BU markiert und im CsCl-Dichtegradienten isoliert wurde.

Die Ergebnisse zeigen, daß

a) unter Einbaubedingungen weniger als 3 Moleküle 3'-TTP pro Zelle existieren,

b) unter der Annahme, 3'-TTP könne in der ganzen Zelle frei diffundieren, die größtmögliche, nur durch Diffusion beschränkte Geschwindigkeit für DNS-Synthese via 3'-TTP mehr als 10 mal kleiner ist als die tatsächlich gemessene Geschwindigkeit der DNS-Synthese.
3'-TTP kommt also als Vorstufe in der DNS-Synthese nicht in Frage.

Literaturverzeichnis

1. Avery, O.T., Macleod, C.M., MacCarty, M.: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J. exp. med. 79, 137 - 158 (1944).
2. Watson, J.D., Crick, F.H.C.: Molecular Structure of Nucleic Acids. Nature London 171, 737 - 738 (1953).
3. Kornberg, A., Lehmann, J.R., Bessmann, M.J., Simms, E.S.: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. Biochim. Biophys. Acta 21, 197 -198 (1956)
4. Cairns, J.: The Bacterial Chromosome and its Manner of Replikation as seen by Autoradiography. J. Mol. Biol. 6, 208 - 213 (1963).
5. Kornberg, A.: Enzymatic Synthesis of DNA. New York (1961).
6. Bollum, F.J.: "Primer" in DNA Polymerase Reactions. Progress in Nucl. Acid Res. 1, 1-26 (1963).
7. Smellie, R.M.S.: Biochemistry of Deoxyribonucleic Acid and Ribonucleic Acid Replication. Brit. Medical Bull. 21, 195 - 202 (1965).
8. Cannelakis, E.S., Kammen, H.O., Morales, D.R.: Studies on the Enzymic Synthesis of Thymidine-3'-Triphosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 184 - 187 (1965).
9. Josse, J., Moffat. J.G.: Syntheses of Deoxynucleoside 3'-Triphosphates. Biochem. 4, 2825 -2831 (1965).
10. Razell, W.E.: Phosphodiesterases. Methods of Enzym. 4, 238 - 258 (1963).
11. Bessmann, M.J., Lehmann, J.R., Adler, J., Zimmermann, S.B., Simms, E.S., Kornberg, A.: Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acidl The Incorporation of Prymidin and Purin Analogues into Deoxyribonucleic Acid. Proc. nat. Acad. Sci. 44, 633 - 640 (1958).
12. Meselson, M., Stahl, F.W., Vinograd, J.: Equilibrium Sedimentation of Makrmolekules in Density Gradients. Proc. nat. Acad. Sci. 43, 581 - 588 (1957).
13. Heppel, L.A., Hilmoe, R.J.: Purification and Properties of 5-Nucleotidase. J. Biol. Chem. 188, 665 - 676 (1951).
14. Garen, A., Levinthal, C.: A Fine-Structure Genetic and Chemical Study of the Enzyme Alkaline Phosphatase of E. Coli. Purification and Characteristion o Alkaline Phosphatase. Biophys. Biochim. Acta 38, 470 - 483 (1960).
15. Lehmann, J.R., Bessmann, M.J., Simms, E.S., Kornberg, A.: Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. Preparation of Substrates and partial Purification of an Enzyme from E. Coli. J. Biol. Chem. 233, 163 -170 (1958)

16. Randerath, K., Randerath, E.J.: Ion-Exchange Chromatography of Nucleotides on Poly-(Etyleneimine)-Cellulose Thin Layers. J. Chrom. 16, 111 - 125 (1964).
Randerath, E., Randerath, K.: Resolution of Complex Nucleotide Mixtures by Two-Dimensional Anionexchange Thin-Layers Chromatography. ibid. 16, 126 - 129 (1964)
17. Neuhardt, J., Randerath, E., Randerath, K.: Ion-Exchange Thin-Layer Chromatography. Resolution of Complex Nucleoside Triphosphate Mixtures. Anal. Biochem. 13, 211 - 222 (1965).
18. Bonhoeffer, F., Gierer, A.: On the Growth Mechanism of the Bacterial Chromosome. J. Mol. Biol. 7, 534 - 540 (1963).
19. Kornberg, A.: Biologic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. Science 131, 1503 - 1508 (1966).
20. Bonhoeffer, F.: Replikation. Fortschritte der Botanik. 28, 142 - 153 (1966).
21. Eigen, M., Hammes, G.G.: Elementary Steps in Enzyme Reactions. Advanc. in Enzym. 25, 1 - 38 (1963).
22. Lehmann, R.C., Pollard, E.: Diffusion Rates in Dsirupted Bacterial Cells. Biophys. J. 5, 109 - 119 (1965)
23. Mitchell, P.: Biochemical Cytology of Microorganisms. Rev. of Microbiol. 13, 407 - 439 (1959).
24. Neuhardt, D.T., Munch-Petersen. A.: Studies on the Acid-Soluble Nucleotide Pool in Thymine-Requiring Mutants of E. Coli during Thymine Starvation. Changes in the Amounts of Deoxycytidine Triphosphate in E. Coli. Biochim. Biophys. Acta 114, 61 - 71 (1966)
25. Schaller, H.: Unveröffentliche Ergebnisse.
26. Price, T.D., Darmstadt, R.A., Hinds, H.N., Zamenhof, S.: Mechanism of Synthesis of Deoxyribonucleic Acid in Vivo. The Heterogeneity of Incorporation of ^{32}P into the Deoxyribonucleotidyl Units in E. Coli. J. Biol. Chem. 242, 140 - 151 (1967).

Lebenslauf

Am 3. Januar 1942 wurde ich, Hermann Seiler, als Sohn des Kinderarztes Dr.med. Robert Seiler und seiner Frau Dr.med. Ilse, geb. Rietschel, in Würzburg geboren.

Nach dem Abitur, das ich im Frühjahr 1961 am Ratsgymnasium in Osnybrück ablegte, besuchte ich für ein Jahr das Leibniz-Kolleg der Universität Tübingen. Während dieses Jahres war ich als Student der Physik eingeschrieben.

Mit dem Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1962 an der Universität Tübingen. Nach dem naturwissenschaftlichen Vorexamen im Februar 1963 studierte ich bis zum Physikum im Herbst 1964 an der Freien Universität in Berlin. Das erste klinische Semester verbrachte ich in Innsbruck. Im Frühjahr 1965 kam ich nach Tübingen zurück. Hier begann ich, neben dem Studium für die Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Schramm am Max-Planck-Institut für Virusforschung zu arbeiten. Die Versuche zu dieser Arbeit wurden im Sommer 1966 abgeschlossen.

Von Oktober 1967 bis Februar 1968 legte ich das medizinische Staatsexamen an der Universität Tübingen ab.